

洋桔梗之組織培養

／陳福旗

無菌播種：商業栽培之種苗，均使用造粒種子播種，有少數日本種苗公司出售沒有造粒的種子，除了撒播於介質外，可以在無菌狀態下使其發芽。將約200～300粒種子放入10cc加蓋玻璃試管，以10%Clorox(或高力士漂白水)約八分滿，以手返復搖盪十分鐘後，用殺菌過的玻璃吸管插到試管底部，將漂白水吸出，再以無菌水洗三次，吸出無菌水的方式同上。

同尖頭鑷子把種子取出，置於MS培養基，其內含20～30克／公升的蔗糖，在照光下(約1500lux)，25℃經4～5天，即可見到種子開始萌芽。約三星期後，第一次移到新培養基，第二個月，小苗即可低溫處理。以試管播種會產生一個問題，即有些苗將有玻璃化(vitrification)的傾向，此時可嘗試提高洋菜粉的濃度。

莖頂及側芽培養：在解剖顯微鏡下，摘取帶有二片葉原體的生長點，加以培養。培養溫度為25℃，照光16小時，光度約1500～2000lux，使用之培養基請參照表1，並加入細胞分裂素 cytokinin。其中最有效的是 benzyladenine(簡稱BA)，使用濃度為1～3mg/l。

除了莖頂外，亦可採取開花株的側芽，經消毒後加以培養，在一到二星期內，即可長出不少芽體，再以此種長出芽體加以分割，可在短期間內產生大量無性繁殖之後代。長出之芽可用MS培養基加上1mg/l之 IBA(indole-3-butyric acid)，使其在試管內發根。經馴化後可移到人工介質，再以低溫處理(18℃約三星期)，即可種植到田間。側芽即使帶有很小的花芽，均可加以培養而產生芽體。由於洋桔梗品種具有變異性，因此可在田間選拔優良單株，以組織培養方法大量繁殖。

莖段、葉片、根及花瓣培養：洋桔梗的葉片、嫩莖、及試管內長的根等，均可加以培養，而產生芽體。葉片以10% Clorox 加兩滴展著劑 Tween-20，消毒10分鐘，以無菌水洗三次後，在培養皿內切成約1公分見方的小片，放置在含有1～3mg/l BA，或BA或加上0.5～1mg/l NAA 之培養基上。則約在二星期後，長出癒合組織，並在切口長出多量芽體。待芽體夠大時，即可切下放在發根培養基。癒合組織亦可加以增殖繼代培養，然後在含細胞分裂素的培養基誘導芽體產生。花梗嫩莖可在消毒後切段，培養後也可長出芽體。試管內的根系，經長期培養可長出不定芽，亦可在含

0.1mg/l BA的培養基中再生芽體，因此可用液態培養基來增殖根，再誘導芽體產生(表2)。未開放的花瓣，可以用葉片培養基，而再生出芽體，因此若有不同花色，即可用此方法加以分離。

花藥培養：由於一代雜交種之種苗較整齊，因此目前洋桔梗多是一代雜交品種。若能在田間選拔優良單株，利用花藥或花粉培養，可望產生單倍體，再經染色體倍加技術，如用秋水仙素處理，則可在短時間內產生同質二倍體純系，作為育種的親本。根據日本的資料顯示，品種間花藥產生癒合組織有差異，且花蕾長度約8~10mm的花藥較易形成癒合組織。據我們所作的試驗，結果亦類似，但多由花藥壁長出，是否會有從花粉長出癒合組織者，則有待進一步檢查。

癒合組織培養：若將葉片組織放在含有2,4-D及BA的培養基，則可誘導出淺綠色半透明的癒合組織，可以在固態培養基、或液態培養基作繼代培養。放在含有細胞分裂素培養基之癒合組織，可誘導再生成芽體。

變異性之利用：經過癒合組織培養，所產生的植株預期變異性，較用莖頂培養者為大。在試管內，可加入秋水仙素來誘導倍數性的變異體。根據 Griesbach 及 Bhat (1990)報告，施用0.05%秋水仙素到莖頂五天，在216株處理過的



側芽培養產生的叢生芽

植株中，有1株是四倍體。自交後產生的四倍體株高較短，莖較粗，花莖和二倍體相似，但花粉稔性只達二倍體的80%。在田間，有時可見到紫花品種的花瓣，長出粉紅的斑塊，如加以培養再生，或許能產生新花色的品種。

基因轉殖：洋桔梗之組織培養系統既已建立，則可利用各種基因轉移方式，將一些抗病蟲基因轉移進入洋桔梗，而產生抗病蟲新品種。目前，在台灣의栽培環境下，重要的病害為立枯病、灰黴病、根腐病等真菌性病害，及由病毒如菜豆黃化箝紋病毒(BYMV)、胡瓜箝紋病毒(CMV)等，重要蟲害如甜菜夜蛾、薊馬、潛葉蠅等。如能找到抗病蟲基因，則可將其轉移到洋桔梗。利用毛狀根農桿菌(*Agrobacterium rhizogenes*)，可以感染洋桔梗，而產生毛狀根，這些根再經培養，即能產生大量芽體。

因此，利用農桿菌或其他基因轉移方法，可望產生新的抗病蟲品種。在花色的表現方面，已經可利用類似方法，改變矮牽牛的花色，預測將來，或許將有不同花色的洋桔梗產生。

表1. MS基本培養基母液之配製及培養基調製

A 液(大量元素, 10倍液)

KNO ₃	19g/l
NH ₄ NO ₃	16.5g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4g/l
KH ₂ PO ₄	1.7g/l

B 液(微量元素, 200倍液)

H ₃ BO ₃	1.24g/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.46g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72g/l
KI	166mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	50mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5mg/l

C 液(鐵螯合劑, 100倍液)

FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78g/l
Na ₂ EDTA	3.73g/l

(本液需用深色瓶裝)

E 液(維他命氨基酸, 200倍液)

Nicotinic acid	100mg/l
Pyridoxine.HCl	100mg/l
Thiamine.HCl	20mg/l
Glycine	400mg/l

D 液(肌醇)Myo-inositol 1g/100ml

E 液(荷爾蒙)－BA 0.5mg/ml, 稱 50mg BA, 溶於 1N HCl 數c.c, 加水定量至 100ml

F 液(荷爾蒙)－IBA 0.5mg/ml, 稱 50mg IBA, 溶於 1N NaOH 數c.c, 加水定量至 100ml

G 液(荷爾蒙)－NAA 0.5mg/ml, 稱 50mg NAA, 溶於 1N NaOH 數c.c, 加水定量至 100ml

配製一公升培養基所需母液用量 (以莖頂培養基為例, 若是無菌播種, 則只加A到D液及蔗糖) 蒸餾水700ml、A液100ml、B液5ml、C液10ml、D液10ml、E液2ml、蔗糖20~30g 洋菜粉7~8g (以Difco Bacto-Agar 為例, 其他廠牌可能有所增減)

pH值 5.6~5.8 (調好pH值後再加洋菜粉)

將體積調整為1公升後以高溫(121°C)高壓(1.21kg/cm²)30分鐘殺菌後混合均勻, 冷至約60°C時倒入無菌塑膠培養皿, 每盤約25ml, 因此1公升可倒40盤。

表2. 洋桔梗組織培養之培養基

培植體	目的	培養基
莖 頂	芽體形成	MS+BA 1.0~2.0 mg/l
莖片、葉片	癒合組織增殖	MS+BA 1.0~2.0 mg/l+NAA 1.0 mg/l
	不定芽再生	MS+BA 1.0~3.0 mg/l+NAA 0~1.0 mg/l
	增 殖	MS+NAA 0.1 mg/l+不含賀爾蒙之培養基
根	不 芽 再 生	MS+BA 0.1 mg/l
花 藥	癒合組織誘導	MS+Kinetin 1.0 mg/l+NAA 2.0 mg/l+蔗糖 50 g/l
	不定芽再生	MS+Kinetin 2.0 mg/l
原生質體	初 期 分 裂	MS+BA 0.1~1.0 mg/l+NNA 0.1~2.0 mg/l+蔗糖 10~30 g/l+mannitol 90 g/l
	癒合組織誘導	MS+BA 0.1~1.0 mg/l+NNA 0.1~2.0 mg/l+蔗糖 10 g/l+mannitol 10 g/l
	不定芽再生	MS+BA 0.3~2.0 mg/l+NAA 0~0.01 mg/l